

Schlaflose Fruchtfliegen durch SLEEPLESS-Verlust**

Jennifer B. Treweek, Amira Y. Moreno und Kim D. Janda*

Genetik · Ionenkanäle · Mutogene · Schlaf

„Du kannst schlafen, wenn du tot bist!“ – so lautet eine an Universitäten und in der Popkultur beliebte Redewendung. Doch die physiologische Notwendigkeit von Schlaf ist unbestreitbar. Wir verbringen ungefähr ein Drittel unseres Lebens mit Schlafen, und jeder kennt sicher die Konsequenzen von Schlafmangel aus erster Hand wie schlechtere Wahrnehmung, verminderte Konzentrationsfähigkeit sowie geschwächte Gesundheit und mangelhaftes Wohlbefinden.^[1–3] Die Notwendigkeit von Schlaf ist nahezu allen Tierarten gemeinsam. Obwohl die Schlafmechanismen von einfachen zu höheren Organismen immer komplexer werden, so scheinen die Homöostase des Schlafs, die Schlafregulation im zirkadianen Rhythmus und die grundlegenden Funktionen des Schlafs vollständig konserviert zu sein. Daher eignen sich einfache Organismen wie die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*,^[4,5] der Zebrafärbling *Danio rerio*^[6] und der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*^[7] zur Untersuchung der Gesetzmäßigkeiten des Schlafes, obwohl sie sich in weniger grundlegenden Schlafmechanismen, wie beispielsweise dem Schlaf-Wach-Zyklus, unterscheiden.^[8] Daher könnte der kürzlich veröffentlichte Beitrag von Koh et al. über eine *Drosophila*-Mutante, deren Schlafbedarf durch Verlust des Proteins SLEEPLESS verringert wird, weitreichende Auswirkungen auf die Erforschung der Schlafhomöostase sowohl in anderen Invertebraten als auch in Vertebraten haben.^[9]

Um die Tragweite des *sleepless*-Gens (*sss*) und seines Genprodukts SLEEPLESS als Signalmolekül zu verstehen, muss man die beiden grundlegenden Mechanismen der Schlafregulation beachten: den Tagesrhythmus und die Schlafhomöostase. Der zirkadiane Rhythmus regelt die Verknüpfung von Schlafzyklen mit der Tageszeit. Fliegen sind wie Menschen tagaktive Tiere, die nachts schlafen. Sie zeigen merklich veränderte Schlafzyklen, wenn *clock*, ein Gen, das für die molekulare Komponente ihrer inneren Uhr zuständig

ist, durch Mutation zerstört wird.^[10] Allerdings fallen *clock*-Mutanten nach 24 Stunden Schlafentzug in einen Nachhol-schlaf, was auf eine intakte homöostatische Regulation hinweist. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Schlafhomöostase in Fliegen unabhängig vom zirkadianen Rhythmus ist.^[5] Weil diese Erkenntnis für das Schlafverhalten vieler Vertebraten gilt, belebte sie die Untersuchung von Genen der inneren Uhr. Diese Gene waren in *Drosophila* und Säugetieren überraschend stark homolog.^[11,12] Seit der ersten Veröffentlichung über den Schlaf von Fruchtfliegen aus dem Jahr 2000 wurden die Genetik und die molekularen Prinzipien des Schlafs anhand dieser Insekten ausführlich studiert.^[4,5] Nicht nur das leicht manipulierbare Genom und das schlichte Nervensystem, auch die den höheren Säugetieren ähnliche Reaktion auf Schlafentzug und psychotrope Verbindungen (z. B. Koffein, Amphetamine, Modafinil) machen Fruchtfliegen zu idealen Forschungsobjekten.^[5]

Nach der erfolgreichen Analyse des Tagesrhythmus durch genetische Studien wurden die genetischen Grundlagen des Schlafs mit ähnlichen Methoden erforscht. Die Rolle von Kaliumkanälen bei Schlafvorgängen in Mäusen^[13] und Menschen^[14] war bereits bekannt, bevor Cirelli und Mitarbeiter vor kurzem die genetische Grundlage für einen Kurzschlaf-Phänotyp in Fliegen entschlüsselten, indem sie 9000 mutierte Fliegenlinien durch zufällige Mutation mit Ethylmethansulfonat (EMS) erzeugten.^[15] Die *minisleep* (*mns*)-Fliegen tragen eine Punktmutation des *Shaker*-Gens, die einen Aminosäureaustausch in der α -Untereinheit des spannungsgesteuerten Kaliumkanals verursacht. Diese Mutation führt dazu, dass Fruchtfliegen einen Schlafmangel eher durch kurze Schlafperioden als durch ausgedehnten Tiefschlaf kompensieren. Die Überreaktion von Fruchtfliegen des *mns*-Phänotyps auf die Störung des Schlafs, die ihre Fähigkeit zur Wiederaufnahme des Schlafzustands einschränkt, verkürzt außerdem ihre Lebensdauer. Interessanterweise werden analoge Schlafstörungen beim Menschen der Fehlfunktion von Kaliumkanälen zugeschrieben,^[16] aber die Verknüpfung zwischen der beeinträchtigten Kanalfunktion und der veränderten Schlafhomöostase muss für beide Organismen noch aufgeklärt werden. Dies unterscheidet die unklare Rolle des Kaliumkanals in der Schlafhomöostase von der offensichtlicheren Rolle in zirkadianen Prozessen. Das Zusammenspiel einer synchronisierten oder zusammenhängenden Öffnung von Kalium- und Calciumkanälen, Schwankungen bei Proteinen der inneren Uhr und elektrische Signale von Schrittmachernuronen führen zu einem periodischen Schlafrhythmus in Fliegen und Säugetieren.^[10,11,13,17,18]

[*] J. B. Treweek, A. Y. Moreno, Prof. Dr. K. D. Janda

Department of Chemistry and Immunology
Skaggs Institute for Chemical Biology
und

Worm Institute of Research and Medicine (WIRM)

The Scripps Research Institute

10550 North Torrey Pines Road (BCC582), CA 92037 (USA)

Fax: (+1) 858-784-2595

E-Mail: kdjanda@scripps.edu

Homepage: <http://www.scripps.edu/chem/janda/>

[**] Wir möchten uns für die Unterstützung durch The Skaggs Institute for Chemical Biology und einen Ruth L. Kirschstein National Research Service Award bedanken, sowie für das Novartis Graduate Fellowship in Organic Chemistry for Women and Minorities.

Die Erkenntnis, dass der Austausch einer Aminosäure des konservierten Kaliumkanals solch eine messbare Fehlfunktion der Schlafhomöostase hervorrufen kann, hat zu der Hypothese geführt, dass die Funktion der Kaliumkanäle direkt mit einem noch nicht identifizierten schlafinduzierenden Signal korreliert ist.^[19] Um die Beziehung zwischen der Erregbarkeit von Neuronen und der Regulation der Schlafhomöostase zu untersuchen, haben Koh und Mitarbeiter in einem großangelegten genetischen Screening die Phänotypen von ca. 3500 mutierten *Drosophila*-Linien mit einer Transposoninsertion charakterisiert. Der Vorteil solcher großangelegter Screenings ist, dass sie durch die Eliminierung von Vorhersagen bezüglich des Phänotyps einer bestimmten Mutante ungerichtet sind, dafür geht man aber ein hohes Risiko ein, da das Auftreten des erwünschten Phänotyps statistisch und daher zufällig ist. Koh und Mitarbeiter waren erfolgreich: Sie entdeckten eine *Drosophila*-Mutantenlinie, deren Mitglieder eine Schlafreduktion von ca. 83 % gegenüber einer Kontrollpopulation zeigen; bei ca. 9 % der Mutanten blieb der Schlaf sogar völlig aus (Abbildung 1). Diese Mutantenlinie zeigte die stärkste Schlafreduktion, die bisher einer Mutation eines Gens zugeschrieben werden konnte, und die anschließende Charakterisierung des als *sleepless* bezeichneten Gens betont dessen Rolle in grundsätzlichem Schlafbedarf (baseline sleep) wie Schlafnachholverhalten (rebound sleep). Der *sss*-Phänotyp ist rezessiv, und *sss*-Homozygotie ist für die Manifestation weniger, kürzerer Schlafperioden nötig. Obwohl sich *sss*-Fliegen leicht unkoordiniert verhalten, zeigen sie normale Tagaktivität und die Zellen, welche die innere Uhr steuern, waren nicht beeinflusst. Die schwerwiegendste Nachteil einer *sss*-Mutation liegt in der verkürzten Lebensdauer, wie sie auch bei *Shaker*-Fliegen auftritt. Insofern bestätigen die *Shaker*- und *sss*-Phänotypen die essenzielle Erholungswirkung des Schlafs.

Während *Shaker*-Fliegen durch Mutagenese bereits identifizierter *Shaker*-Gene erzeugt wurden, war das *sss*-Gen (Gen CG33472 im *Drosophila*-Genomprojekt) vor diesen Studien nicht charakterisiert worden. Der hier beschriebene,

als *sss*^{P1} bezeichnete Phänotyp zeichnet sich durch die Insertion eines DNA-Transposons namens P-Element in den offenen Leserahmen des Gens aus, wodurch die Expression des SSS-Proteins unterbrochen wurde. Zusätzlich zur *sss*^{P1}-Mutante wurde eine zweite Mutante (*sss*^{P2}) durch Insertion eines Transposons (f01257) in den 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) des letzten codierenden Exons erzeugt. Um die Effekte dieser Mutationen auf die Schlafhomöostase zu eruieren, wurden *sss*^{P1}-, *sss*^{P2}- und *sss*^{P2/P1}-Mutanten in der Nacht mechanisch stimuliert, und anschließend wurde der Wiedereintritt in den Schlafzustand bestimmt. Alle Mutanten zeigten wenig bis keinen Wiedereintritt in den Schlafzyklus – ein Indikator für eine gestörte Schlafhomöostase. Für einen aussagekräftigen Vergleich der Reaktion verschiedener Mutanten auf Schlafentzug wird ein ähnliches Schlafmuster aller Subjekte benötigt. Zufälligerweise ist der grundsätzliche Schlafbedarf homozygoter *sss*^{P2}-Fliegen unverändert im Vergleich zu einer Kontrollpopulation. Die transheterozygoten *sss*^{P2/P1}-Mutanten zeigten 30 % weniger Schlaf. Diese Zusammenhänge zwischen dem Genotyp und Schlafphänotyp belegen, dass die homöostatische Schlafregulation an das *sss*-Gen gekoppelt ist. Weiterhin wiesen die Autoren nach, dass die Menge an täglichem Schlaf jeder Mutante direkt mit der Menge an SSS-Protein in Fliegenkopfflysaten korreliert ist. Interessanterweise variiert die Menge dieses extrazellulären, GPI-verankerten Membranproteins des Gehirns weder im Lauf des Tagesrhythmus noch bei Schlafentzug.

Die Aufklärung solcher Mechanismen könnte zur Entwicklung neuer Ansätze führen, um die Schlafqualität zu verbessern, doch die Übertragbarkeit dieser Studien auf Menschen wird noch kontrovers diskutiert. Besonders die Bedeutung der *sss*-Mutation für den zirkadianen Rhythmus und die Schlafhomöostase wird durch das Fehlen eines SSS-Homologs in Vertebraten verhindert. Das *sss*-Gen unterscheidet sich hierin vom *Shaker*-Gen der Fruchtfliegen, für das im Säugetiergenom gleich mehrere Gegenstücke existieren. Die Veröffentlichung der Beziehung zwischen *Shaker*-Mutanten und Fruchtfliegen mit phänotypischem Kurzschlaf

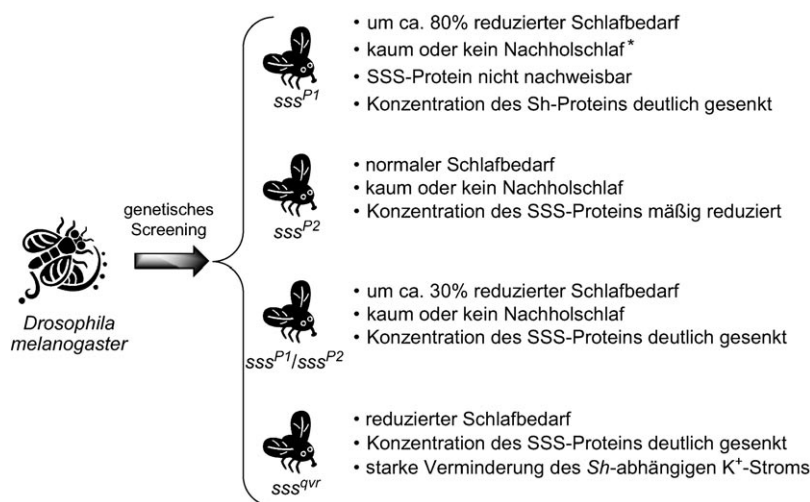


Abbildung 1. Phänotypen und genetische Analysen der *sss*-Mutanten. *: Die Beurteilung des Ausmaßes an Nachholschlaf ist schwierig, da dem *sss*^{P1}-Phänotyp mit reduziertem Schlafbedarf nur eine begrenzte Menge an Schlaf entzogen werden kann. Sh = Shaker.

haben die Untersuchung des murinen *Kcna2*-Gens angeregt, das für Kv1.2, die α -Untereinheit eines Shaker-artigen spannungsgesteuerten K^+ -Kanals, codiert.^[15] Kv1.2 steuert die Erregbarkeit von Neuronen und beeinflusst den Nicht-REM-Schlaf (REM = rapid eye movement). Wie *Shaker*- und *Hyperkinetic*-Fliegen zeigen *Kcna2*-Mausjungtier-Nullmutanten keine Anzeichen von unterbrochenem Schlaf oder Hyperaktivität.^[20] Während die Ergebnisse der Shaker-Studien zu entsprechenden Studien an der Kv1-Familie (einem Säugetierhomolog) geführt haben, ist eine vergleichbare Erweiterung der Ergebnisse von Untersuchungen mit dem *sleepless*-Gen weniger offensichtlich. Unabhängig davon hat die Studie von Koh und Mitarbeitern entscheidend dazu beigetragen, die Auswirkung der Erregbarkeit von Neuronen auf den Schlaf aufzuklären. Das *sss*-Gen scheint maßgeblich an der Genexpression von Shaker-Kanälen beteiligt zu sein, da sich *sss*-Mutationen negativ auf die Konzentration dieser Proteine auswirken. Koh und Mitarbeiter vermuten, dass SLEEPLESS nicht nur durch seine Shaker-Kaliumkanalaktivität die Membranerregbarkeit beeinflusst, sondern auch als Signalmolekül das Schlafbedürfnis und die Schlaftiefe dynamisch steuert.

Die hier beschriebene Charakterisierung des *sleepless*-Gens hat beispielhaft gezeigt, wie ein großangelegtes Screening von *Drosophila*-Schlafmutanten nach schlafrelevanten Genen wesentliche Einblicke in die zellulären Vorgänge der Schlafhomöostase geben kann.

Online veröffentlicht am 15. Dezember 2008

[1] E. M. Robertson, A. Pascual-Leone, D. Z. Press, *Curr. Biol.* **2004**, *14*, 208.

- [2] T. H. Turner, S. P. Drummond, J. S. Salamat, G. G. Brown, *Neuropsychology* **2007**, *21*, 787.
- [3] M. H. Bonnet, D. L. Arand, *J. Intern. Med.* **2003**, *254*, 23.
- [4] J. C. Hendricks, S. M. Finn, K. A. Panckeri, J. Chavkin, J. A. Williams, A. Sehgal, A. I. Pack, *Neuron* **2000**, *25*, 129.
- [5] P. J. Shaw, C. Cirelli, R. J. Greenspan, G. Tononi, *Science* **2000**, *287*, 1834.
- [6] I. V. Zhdanova, S. Y. Wang, O. U. Leclair, N. P. Danilova, *Brain Res.* **2001**, *903*, 263.
- [7] D. M. Raizen, J. E. Zimmerman, M. H. Maycock, U. D. Ta, Y. J. You, M. V. Sundaram, A. I. Pack, *Nature* **2008**, *451*, 569.
- [8] J. E. Zimmerman, N. Naidoo, D. M. Raizen, A. I. Pack, *Trends Neurosci.* **2008**, *31*, 371.
- [9] K. Koh, W. J. Joiner, M. N. Wu, Z. Yue, C. J. Smith, A. Sehgal, *Science* **2008**, *321*, 372.
- [10] J. H. Park, C. Helfrich-Forster, G. Lee, L. Liu, M. Rosbach, J. C. Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3608.
- [11] C. Cajochen, J. K. Wyatt, C. A. Czeisler, D. J. Dijk, *Neuroscience* **2002**, *114*, 1047.
- [12] E. Naylor, B. M. Bergmann, K. Krauski, P. C. Zee, J. S. Takahashi, M. H. Vitaterna, F. W. Turek, *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 8138.
- [13] F. Espinosa, G. Marks, N. Heintz, R. H. Joho, *Genes Brain Behav.* **2004**, *3*, 90.
- [14] K. A. Josephs, M. H. Silber, R. D. Fealey, T. B. Nippoldt, R. G. Auger, S. Vernino, *J. Clin. Neurophysiol.* **2004**, *21*, 440.
- [15] C. Cirelli, D. Bushey, S. Hill, R. Huber, R. Kreber, B. Ganetzky, G. Tononi, *Nature* **2005**, *434*, 1087.
- [16] K. A. Kleopa, L. B. Elman, B. Lang, A. Vincent, S. S. Scherer, *Brain Res.* **2006**, *129*, 1570.
- [17] M. N. Nitabach, J. Blau, T. C. Holmes, *Cell* **2002**, *109*, 485.
- [18] J. H. Benington, M. C. Woudenberg, H. C. Heller, *Brain Res.* **1995**, *692*, 86.
- [19] J. C. Hendricks, *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 703.
- [20] C. L. Douglas, V. Vyazovskiy, T. Southard, S. Y. Chiu, A. Messing, G. Tononi, C. Cirelli, *BMC Biol.* **2007**, *5*.